

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Januar 2004 (22.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/007705 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/04,
15/53, 15/63FAURIE, Robert [DE/DE]; Braunschweiger Str. 3b,
38154 Königslutter (DE). KLASSEN, Birgit [DE/DE];
Neumarkt Str. 3, 38108 Braunschweig (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002290

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Juli 2003 (08.07.2003)(74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM
JÜLICH GMBH; Fachbereich Patente, 52425 Jülich
(DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): BR, JP, KR, MX, US,
ZA.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 31 297.4 10. Juli 2002 (10.07.2002) DE(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH
[DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich (DE).
AMINO GMBH [DE/DE]; An der Zucker-Raffinerie 10,
38373 Frellstedt (DE).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten

(72) Erfinder; und

Veröffentlicht:

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): EGGELING,
Lothar [DE/DE]; Elsenkamp 6, 52428 Jülich (DE).
PETERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Martinusstr.
2a, 52428 Jülich (DE). NETZER, Roman [DE/DE];
Adolf-Fischer-Str. 47, 52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstr. 71, 52428 Jülich (DE).

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES THAT ENCODE DEREGULATED PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASES OF CORYNEFORM BACTERIA AND METHOD FOR PRODUCING L-SERINE

(54) Bezeichnung: NUKLEOTIDSEQUENZEN CODIEREND FÜR DEREGULIERTE PHOSPHOGLYCERAT-DEHYDROGENASEN CORYNEFORMER BAKTERIEN SOWIE VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON L-SERIN

(57) Abstract: The invention relates to nucleotide sequences of coryneform bacteria that encode proteins that are involved in the biosynthesis of L-serine and to a method for producing L-serine. According to the invention, at least 79 amino acids at the C terminus of the wild-type *serA* sequence are deleted, thereby producing a 3-phosphoglycerate dehydrogenase having a reduced feedback inhibition by L-serine vis-à-vis the wild-type sequence.(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin. Durch Deletion von mindestens 79 Aminosäuren im C-Terminus der Wild Typ *serA* Sequenz konnte eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mit einer gegenüber dem Wild Typ verringerten Feedback Inhibition durch L-Serin erzeugt werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

B e s c h r e i b u n g

Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für
an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine
sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin

Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer
Bakterien codierend für an der Biosynthese von L-Serin
beteiligte Proteine sowie Verfahren zur Herstellung von
L-Serin.

5

Die Aminosäure L-Serin findet in der Nahrungsmittel-,
Futtermittel- und Pharmaindustrie, sowie in der Human-
medizin Anwendung. Darüber hinaus dient sie als Bau-
stein für die Synthese weiterer industriell verwert-
10 barer Produkte, wie z. B. L-Tryptophan aus Indol und
L-Serin.

Es ist bekannt, dass L-Serin durch Fermentation von
Stämmen coryneformer Bakterien hergestellt werden kann.
So ist z. B. ein Stamm von *Corynebacterium glycinophi-*
15 *lum* in der Lage, L-Serin aus Glycin und Kohlenhydraten
zu bilden (Kubota K, Kageyama K, Shiro T und Okumura S
(1971) Journal of General Applications in Microbiology,
17: 167-168; Kubota K, Kageyama K, Maeyashiki I, Yamada
K und Okumura S (1972) Journal of General Applications
20 in Microbiology 18: 365). An der Umsetzung von Glycin
zu L-Serin ist hier das Enzym L-Serin-Hydroxymethyl-
transferase beteiligt (Kubota K und Yokozeki K (1989)
Journal of Fermentation and Bioengineering, 67(6):387-
390). Die verwendeten Stämme weisen darüber hinaus
25 einen verminderten L-Serin-Abbau auf, der auf eine Ver-

ringerung der Aktivität des Enzyms L-Serin-Dehydratase zurückzuführen ist (Kubota K, Kageyama K, Shiro T und Okumura S (1971) Journal of General Applications in Microbiology, 17: 167-168; Kubota K (1985) Agricultural
5 Biological Chemistry, 49:7-12).

Weiterhin wird L-Serin fermentativ aus Methanol und Glycin unter Zuhilfenahme methyilotropher Bakterien, wie z. B. *Hyphomicrobium* Stämmen, produziert (Izumi Y, Yoshida T, Miyazaki SS, Mitsunaga T, Ohshiro T, Shiamo
10 M, Miyata A und Tanabe T (1993) Applied Microbiology and Biotechnology, 39: 427-432). In beiden Fällen muss die Aminosäure Glycin als Vorstufe für die Bildung der Aminosäure L-Serin eingesetzt werden.

Ferner sind coryneforme Bakterien bekannt, die L-Serin
15 direkt aus Kohlenhydraten, ohne zusätzliche Beigabe weiterer Vorstufen produzieren können. Diese Stämme, die zu der Gattung *Corynebacterium glutamicum* gehören, weisen sich dadurch aus, dass sie z. B. resistent gegen die L-Serin-Analoga Serin-Hydroxamat und β -Chloroalanin
20 sind und durch ungerichtete Mutagenese erhalten wurden (Yoshida H und Nakayama K (1974) Nihon-Nogei-Kagaku-kaishi 48: 201-208).

Darüber hinaus sind *Brevibacterium flavum* Stämme be-
25 kannt, die durch ungerichtete Mutagenese Defekte im L-Serin-Abbau aufweisen, eine erhöhte Aktivität der durch *serA* kodierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase besitzen, und die aus *Escherichia coli* stammenden Gene *serB* und *serC* überexprimieren (EP0931833A2). Das hier-
30 bei verwendete deregulierte *serA*-Gen wurde durch ungerichtete Mutagenese gewonnen und unterscheidet sich vom Wild Typ Gen nur durch einen einzigen Basenaustausch. Die Expression dieses Gens beinhaltet den Nachteil,

dass es leicht zu einer Revertierung und damit zur Zurückführung in den regulierten Zustand kommen kann.

Ein Nachteil bisher bekannter 3-Phosphoglycerat-
5 Dehydrogenasen liegt in ihrer Feedback Inhibition durch L-Serin, wodurch beispielsweise die Produktivität der mikrobiellen Herstellung von L-Serin verringert wird. Die Region, die für diese Regulation durch L-Serin verantwortlich ist, ist der C-Terminus des Proteins. Aus
10 WO 93/12235 ist eine DNA bekannt, die für eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus E. coli codiert, deren C-Terminus zu 25% verändert, komplett deletiert oder in den in einem bestimmten Bereich eine Insertion durchgeführt wurde, so dass eine geringere Inhibition
15 durch L-Serin zu verzeichnen war. Diese 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase wies jedoch nur noch eine geringe Aktivität auf. Eine verbesserte L-Serinproduktion wurde mit der deregulierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nicht nachgewiesen.

20 Die Wild Typ *serA* Sequenz ist allgemein bekannt und kann den dem Fachmann bekannten Datenbanken oder dem beigefügten Sequenzprotokoll gemäß SEQ ID No. 6 entnommen werden.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Maßnahmen zur Verfügung zu stellen, mit denen die zuvor genannten
25 Nachteile beseitigt werden können und die zu einer verbesserten Produktion von L-Serin oder davon ableitbaren Stoffwechselprodukten wie z. B. Tryptophan führen. Es ist somit Aufgabe der Erfindung Nukleinsäuren, codierend für eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, bereit-
30 zustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen eine verringerte Feed-

back Inhibition durch L-Serin unter Erhalt der Aktivität aufweist. In diesem Zusammenhang ist es weiterhin Aufgabe der Erfindung eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase sowie Mikroorganismen bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen bzw. Mikroorganismen mit einer 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, eine verringerte Feedback Inhibition durch L-Serin unter Erhalt der Aktivität aufweisen. Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin bereitzustellen.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1, 2, 3, 4 oder 5 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1, 2, 3, 4 oder 5 angegebenen Merkmalen. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 9 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 9 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird außerdem ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 10 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 10 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird ebenso ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 11 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 11 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird weiterhin ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 20 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 20 angegebenen Merkmalen. Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 26 wird die Aufgabe ebenfalls erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 26 angegebenen Merkmale. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 27

erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 27 angegebenen Merkmale.

- Mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie Polypeptiden ist es nunmehr möglich, eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden oder gentechnisch nicht veränderten Nukleinsäuren bzw. Enzymen keine bzw. eine verringerte L-Serin Feedback Inhibierung unter Erhalt der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität aufweist.
- 10 Diese Eigenschaft wird im Folgenden unter der Bezeichnung „dereguliert“ zusammengefasst. Weiterhin ist es möglich Mikroorganismen und Verfahren bereitzustellen, mit denen eine L-Serinproduktion mit gegenüber bisher bekannten mikrobiellen Verfahren höheren Ausbeuten möglich ist.
- 15

Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

- 20 /Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung von Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, im Folgenden mit PGD bezeichnet, enthaltend eine Gensequenz *serA* gemäß SEQ ID No 1, 2, 3, 4 oder 5 oder ein Allel, Homolog oder
- 25 Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen. Die Nukleinsäure gemäß SEQ ID No 1, die für eine PGD mit einer Deletion von 197 Aminosäuren im C-Terminus codiert, hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen.

30

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus coryneformen Bakterien, bevor-

- zugt der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* besonders bevorzugt aus *Corynebacterium glutamicum*, isoliert werden. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 sowie *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806 oder auch *Brevibacterium flavum* ATCC 14067. Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete Mutanten oder Produktionsstämme sind, Organismen aus der Gruppe *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Methylobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Alcaligenes* oder *Klebsiella*. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.
- 15 Unter einer Nukleinsäure oder einem Nukleinsäurefragment ist erfindungsgemäß ein Polymer aus RNA oder DNA zu verstehen, das einzel- oder doppelsträngig sein kann und optional natürliche, chemisch synthetisierte, modifizierte oder artifizielle Nukleotide enthalten kann.
- 20 Der Begriff DNA-Polymer schließt hierbei auch genomische DNA, cDNA oder Mischungen davon ein.

- Unter Allelen sind erfindungsgemäß funktionell Äquivalente, d. h. im wesentlichen gleichwirkende Nukleotidsequenzen zu verstehen. Funktionell äquivalente Sequenzen sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz, beispielsweise durch die Degenerierung des genetischen Codes bedingt noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene und gegebenenfalls an den
- 30

Kodongebrauch des Wirtsorganismus angepasste Nukleotidsequenzen.

- Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste.
- 5 Inbegriffen sind hier auch sogenannte Sinnmutationen, die auf Proteinebene beispielsweise zum Austausch konservierter Aminosäuren führen können, welche aber zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen und somit funktionsneutral sind. Dies
- 10 beinhaltet auch Veränderungen der Nukleotidsequenz, die auf Proteinebene den N-Terminus eines Proteins betreffen, ohne jedoch die Funktion des Proteins wesentlich zu beeinträchtigen.
- 15
- 20 Durch die vorliegende Erfindung werden auch solche Nukleotidsequenzen umfasst, welche man durch Modifikation der Nukleotidsequenz, resultierend in entsprechenden Derivaten, erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z. B. auch die Einfügung
- 25 weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

- Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen Gegenstand der vorliegenden Erfindung, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschten Eigenschaften vermitteln. Solche
- 30 artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung von mittels computergestützten Programmen (molecular modelling) erstellten Proteinen oder

durch in-vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für den Wirtsorganismus spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit molekulargenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertung anderer, bereits bekannter Gene des zu transformierenden Organismus leicht ermitteln.

10 Unter homologen Sequenzen sind erfindungsgemäß solche zu verstehen, die zu den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen komplementär sind und/oder mit diesen hybridisieren. Der Begriff hybridisierende Sequenzen schließt erfindungsgemäß substanziell ähnliche Nukleotidsequenzen aus der Gruppe von DNA oder RNA ein, die unter an sich bekannten stringenten Bedingungen eine spezifische Wechselwirkung (Bindung) mit den zuvor genannten Nukleotidsequenzen eingehen. Hierzu zählen auch kurze Nukleotidsequenzen mit einer Länge von beispielsweise 10 bis 15 30, bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden. Dies umfaßt erfindungsgemäß u.a. auch sogenannte Primer oder Sonden.

Erfindungsgemäß sind auch die den codierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'-oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'-oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder die RNA Prozessierung sowie die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u.a. Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren oder Translationsverstärker.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Genstruktur enthaltend wenigstens eine der zuvor beschriebenen Nukleotidsequenzen codierend für eine deregulierte PDG sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen, welche die Expression der codierenden Sequenzen in der Wirtszelle steuern.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor enthaltend eine Nukleotidsequenz der zuvor beschriebenen Art codierend für eine deregulierte PDG, mit diesen operativ verknüpfte regulative Nukleotidsequenzen sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion transformierter Wirtszellen, für die Replikation innerhalb der Wirtszelle oder zur Integration in das entsprechende Wirtszell-Genom. Ferner kann der erfindungsgemäße Vektor eine Genstruktur der vorgenannten Art enthalten.

✓ Als Vektoren eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden wie z. B. pZ1 (Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, *Appl Environ Microbiol* 55(3): 684-688), pEKEx2 (Eikmanns et al., *Gene* 102: 93-98 (1991) , pVWEx oder pXMJ19. Andere Plasmidvektoren können in gleicher Weise verwendet werden. Diese Aufzählung ist für die vorliegende Erfindung jedoch nicht limitierend.

Unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können entsprechende Sonden oder auch Primer synthetisiert und dazu verwendet werden, beispielsweise mit Hilfe der PCR-Technik analoge Gene aus anderen Mikroorganismen, bevorzugt coryneformen Bakterien zu amplifizieren und isolieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine, wobei diese Sonde ausgehend von den

5 erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen der zuvor beschriebenen Art hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält. Bei der Sonde kann es sich um einen Teilausschnitt der erfindungsgemäßen Sequenz, beispielsweise aus einem konservierten Bereich

10 handeln, der z. B. eine Länge von 10 bis 30 oder bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden aufweist und unter stringenten Bedingungen spezifisch mit homologen Nukleotidsequenzen hybridisieren kann. Geeignete Markierungen sind aus der Literatur zahlreich bekannt. Anleitungen hierzu

15 findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994) oder beispielsweise im

20 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260).

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine deregulierte PGD oder ein Teil davon, kodiert durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 1, 2, 3, 4 oder 5 oder deren Variationen der zuvor

30 beschriebenen Art. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso eine deregulierte PGD mit einer Aminosäuresequenz gemäß der SEQ ID No 7, 8, 9, 10 oder 11 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon oder Mischungen daraus. Als beson-

ders geeignet hat sich eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 7 erwiesen.

- 5 Unter Isoformen sind Enzyme mit gleicher oder vergleichbarer Substrat- und Wirkungsspezifität zu verstehen, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.
- 10 Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Enzyme zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion des Enzyms zu beeinträchtigen. Diese Ver-
- 15 änderungen können in Form von Aminosäureaustauschen nach an sich bekannten Methoden vorgenommen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Polypeptide mit der Funktion einer deregulierten PGD, die in ihrer

20 Aminosäuresequenz derart verändert sind, dass sie gegenüber regulatorisch wirkenden Verbindungen, beispielsweise die sie in ihrer Aktivität regulierenden Stoffwechsel-Endprodukte (L-Serin) desensitiv sind (feedback-desensitiv).

25

Die erfindungsgemäßen Polypeptide zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, besonders bevorzugt der Art Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium besonders bevorzugt aus Corynebacterium

30 glutamicum stammen. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, sowie Corynebacterium

- acetoglutamicum ATCC 15806 oder auch Brevibacterium flavum ATCC 14067. Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete Mutanten oder Produktionsstämme sind Organismen aus der Gruppe Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia, Methylobacterium, Hyphomycrobium, Alcaligenes oder Klebsiella. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.
- 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Übertragung wenigstens einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder eines Teils davon codierend für eine deregulierte PGD, ein Allel, Homolog oder Derivat davon in ein Wirtssystem. Dies schließt auch die Übertragung eines erfindungsgemäßen Genkonstrukts oder Vektors in ein Wirtssystem ein. Diese Übertragung von DNA in eine Wirtszelle erfolgt nach gentechnischen Methoden. Als bevorzugtes Verfahren sei hier die Transformation und besonders bevorzugt die Übertragung von DNA durch Elektroporation genannt.

- Als besonders geeignet hat sich ein homologes Wirtssystem erwiesen. Unter einem homologen Wirtssystem sind Mikroorganismen zu verstehen, die alle einer verwandten Familie angehören. Erfindungsgemäß sind hierunter coryneforme Bakterien zu verstehen, in die die erfindungsgemäß aus coryneformen Bakterien isolierten Nukleinsäuren eingebracht werden. Ein aus einer erfolgreich durchgeführten Nukleinsäureübertragung resultierender transformierter Mikroorganismus unterscheidet sich somit von dem entsprechend nicht transformierten Mikroorganismus dadurch, dass er zusätzliche Nukleinsäuren der erfindungsgemäßen Art enthält und entsprechend zur Aus-

prägung bringen kann. Stellvertretend für ein geeignetes homologes Wirtssystem sei das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* und bevorzugt der Stamm ATCC 13032 genannt. Als Kulturmedium ist je nach Anforderungen ein

5 Komplexmedium wie z. B. LB Medium (T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989)) oder auch ein Mineralsalzmedium, wie z. B. CGXII-Medium (Keilhauer, C. et al 1993, *J. Bacteriol.*, 175:5593-5603) geeignet. Nach entsprechender

10 Kultivierung kann die Bakteriensuspension geerntet und zur weiteren Untersuchung, beispielsweise zur Transformation oder zur Isolierung von Nukleinsäuren nach gängigen Methoden eingesetzt werden. Diese Vorgehensweise

15 kann analog auch auf andere coryneforme Bakterienstämme angewendet werden. Dabei werden als Wirtssysteme Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* bevorzugt. Innerhalb der Gattung *Corynebacterium* wird besonders die Art *Corynebacterium glutamicum* und inner-

20 halb der Gattung *Brevibacterium* besonders die Art *Brevibacterium flavum* bevorzugt. Zu den Vertretern dieser Gattungen zählen zum einen Stämme, die in ihren Eigenschaften als Wild Typ charakterisiert sind. Hier sind beispielsweise *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032,

25 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 und *Brevibacterium divaricatum*

30 ATCC 14020 zu nennen.

Darüber hinaus schließt die vorliegende Erfindung auch Bakterienstämme als Wirtssystem ein, die sich als

L-Serin produzierende Mutanten oder Aminosäureproduktionsstämme auszeichnen. Diese können z. B. ausgehend von Wildtypstämmen durch klassische (chemische oder physikalische) oder gentechnische Methoden hergestellt werden. Beispiele für erfindungsgemäß geeignete Stämme sind u. a. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21586, *Corynebacterium glutamicum* KY 10150, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 Δ panBC und *Brevibacterium ketoglutamicum* ATCC 21222. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktionsstämme geeignet, die dem Fachmann aus mikrobiellen Herstellungsverfahren bekannt sind, wie z. B. Enterobakterien, Bacillaceen oder Hefe-Arten. Die vorliegende Erfindung wird durch die ausgewählten Beispiele an Mikroorganismen näher charakterisiert, jedoch nicht limitiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine erfindungsgemäße Nukleinsäure der zuvor beschriebenen Art, welche im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist.

Ebenso umfasst die vorliegende Erfindung einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur oder einen Vektor der zuvor beschriebenen Art.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist darüber hinaus auch ein genetisch veränderter Mikroorganismus enthaltend ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit der Funktion einer deregulierten PGD der zuvor beschriebenen

Art, welches eine im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus eine verringerte bzw. keine feedback Inhibierung durch L-Serin unter Erhalt der PGD-Aktivität aufweist. Ein erfindungsgemäß genetisch veränderter Mikroorganismus zeichnet sich ferner dadurch aus, daß er ein coryneformes Bakterium, bevorzugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, besonders bevorzugt der Spezies Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium flavum ist.

10

Prinzipiell können Gene durch an sich bekannte Methoden, wie beispielsweise die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Hilfe von kurzen, synthetischen Nukleotidsequenzen (Primern) amplifiziert und anschließend isoliert werden. Die Herstellung der verwendeten Primer erfolgt im Allgemeinen anhand bekannter Gensequenzen aufgrund bestehender Homologien in konservierten Bereichen der Gene und/oder unter Berücksichtigung des GC-Gehalts der DNA des zu untersuchenden Mikroorganismus.

20

Eine weitere Vorgehensweise zur Isolierung von codierenden Nukleotidsequenzen ist die Komplementation von sogenannten Defekt-Mutanten des zu untersuchenden Organismus, die zumindest phänotypisch einen Funktionsverlust in der Aktivität des zu untersuchenden Gens oder entsprechenden Proteins aufweisen. Unter einer Komplementation ist die Aufhebung des Gendefektes der Mutante und weitgehende Wiederherstellung des ursprünglichen Erscheinungsbildes vor der Mutagenese zu verstehen, die durch die Einbringung funktioneller Gene oder Genfragmente aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus erreicht wird.

30

Ein klassisches Mutagenese-Verfahren zur Herstellung von Defektmutanten ist beispielsweise die Behandlung der Bakterienzellen mit Chemikalien wie z. B. N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder UV-Bestrahlung.

- 5 Derartige Verfahren zur Mutationsauslösung sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder
10 im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

- Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein
15 Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin, wobei wenigstens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, isoliert aus einem coryneformen Bakterium, in einen Wirtsorganismus übertragen und dort exprimiert werden, wobei die Genexpression und/oder die Aktivität des
20 entsprechend kodierten Polypeptids gegenüber dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöht ist, dieser genetisch veränderte Mikroorganismus zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin eingesetzt wird und das entsprechend gebildete L-Serin aus dem
25 Kulturmedium isoliert wird.

- Zur Erzielung einer erhöhten Genexpression (Überexpression) kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden. Ferner kann die Promotor- und/oder Regulationsregion und/oder die Ribosomenbindungsstelle, die
30 sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, entsprechend so verändert werden, dass die Expression mit erhöhter Rate erfolgt. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens einge-

baut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Serin Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Weiterhin kann auch die Aktivität des Enzyms selbst erhöht sein oder durch die Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins verstärkt werden. Alternativ kann ferner eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (BioRechnology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Die erfindungsgemäß hergestellten genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinu-

ierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Serin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,

Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.

Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzu gegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt.

Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird so lange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Serin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse der L-Serin-Bildung kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben,

oder sie kann durch reversed Phase HPLC erfolgen so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

- 5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Serin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um die zuvor bereits näher beschriebenen Ver-
- 10 treter coryneformer Bakterien handeln. Eine Auswahl an Ergebnissen der Fermentation ist in Tabelle 6 dargestellt. Hierbei zeichnen sich die erfindungsgemäß genetisch veränderten Mikroorganismen durch eine wesentlich verbesserte L-Serin-Produktion gegenüber den entspre-
- 15 chend nicht transformierten Mikroorganismen (Wild Typen) oder den Mikroorganismen aus, die lediglich den Vektor ohne Gen-Insert enthalten. In einer besonderen Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung ist gezeigt, dass die Überexpression des homologen C-terminal
- 20 verkürzten *serA*-Gens in *C. glutamicum* ATCC 13032DpanBCpZ1*serA*Δ197 zu einer wenigstens 40%igen Steigerung der L-Serin Akkumulation im Medium im Vergleich zu den Kontrollstämmen führt (Tab. 6). Durch die gemeinsame Überexpression weiterer Gene, die positiv
- 25 auf den L-Serinbiosyntheseweg wirken, ist eine noch weitere Steigerung der L-Serin-Produktion zu erwarten.

Unter Aminosäure-Produktionsstämmen sind im Sinne der vorliegenden Erfindung Corynebacterium glutamicum-

30 Stämme oder homologe Mikroorganismen zu verstehen, die durch klassische und/oder molekulargenetische Methoden derart verändert sind, dass ihr Stoffwechselfluss verstärkt in die Richtung der Biosynthese von Aminosäuren

oder deren Abkömmlingen verläuft (metabolic engineering). Beispielsweise sind bei diesen Aminosäure-Produktionsstämmen ein oder mehrere Gen(e) und/oder die korrespondierenden Enzyme, die an entscheidenden und
5 entsprechend komplex regulierten Schlüsselpositionen des Stoffwechselweges (Flaschenhals) stehen in ihrer Regulation verändert oder sogar dereguliert. Die vorliegende Erfindung umfasst hierbei sämtliche bereits bekannte Aminosäure-Produktionsstämmen, bevorzugt der
10 Gattung *Corynebacterium* oder homologer Organismen. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktionsstämmen umfaßt, die der Fachmann in Analogie zu Erkenntnissen aus anderen Mikroorganismen, beispielsweise *Enterobacterien*, *Bacillaceen* oder Hefe-Arten nach gängigen
15 Methoden herstellen kann.

Die Figuren zeigen beispielhaft verwendete Plasmide sowie einen Vergleich der Primärstruktur der PGD und mittels PCR konstruierter Allele von *serA*.

20

Es zeigt:

Fig. 1: Vergleich der Primärstruktur der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PGD) aus verschiedenen Organismen; Skalierung entspricht der Anzahl an Aminosäuren
25 der corynebakteriellen PGD; N = Aminoterminal; C = Carboxyterminal; der mit einer hell grauen Fläche markierte Bereich A stellt die Nukleotid-Bindungsstelle dar; der mit einer dunkel grauen Fläche markierte Bereich B
30 stellt die Substrat-Bindungsstelle dar; der schwarz markierte Bereich C stellt die Inhibitor-Bindungsstelle dar.

Darüber hinaus gibt es zwei weitere Gruppen von 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die exemplarisch durch *E. coli* (Tobey K.L. und Grant G.A., 1986, J. Biol. Chem., 261: 12179-12183) bzw. *Thermotoga maritima* (GenBank-Accession-Nummer AE000512) vertreten sind. Hierbei ist das Protein des hyperthermophilen Bakteriums *T. maritima* mit einer Länge von 327 Aminosäuren am kürzesten, während die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *E. coli* mit 410 Aminosäuren eine intermediäre Länge aufweist.

Fig. 2: Übersicht über die mittels PCR konstruierten Allele von *serA*, die für die deregulierte, C-terminal verkürzte PGD codieren. Gezeigt ist der *serA*-Genbereich des Wild Typs (oben) und die erfindungsgemäßen Deletionskonstrukte. Die hell, dunkel und schwarz markierten Bereiche entsprechen der Definition wie in Fig. 1.

Fig. 3: Plasmidvektor pZ1*serA*
Fig. 4: Plasmidvektor pZ1*serA*Δ79
Fig. 5: Plasmidvektor pZ1*serA*Δ188
Fig. 6: Plasmidvektor pZ1*serA*Δ197
Fig. 7: Plasmidvektor pZ1*serA*Δ205
Fig. 8: Plasmidvektor pZ1*serA*Δ211

25

Ausführungsbeispiele:

1. Gezielte Deregulation der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*
 - a) Computergestützter Aminosäuresequenz-Vergleich der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium*

glutamicum mit 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen an-
derer Organismen

Es wurde zunächst eine Strategie zur Konstruktion einer
5 deregulierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase entwi-
ckelt. Es wurde die Sequenz des *serA*-Gens, das für die
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* ko-
diert, aus der Patent-Datenbank verwendet (Nakagawa, S.,
Mizoguchi, H., Ando, S., Hayashi, M., Ochiai, K., Yokoi, H.,
10 Tateishi, N., Senoh, A., Ikeda, M. and Ozaki, A. Patent: EP
1108790-A 7064 20-JUN-2001; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
(JP); Pompejus, M., Kroeger, B., Schroeder, H., Zelder, O.
and Haberhauer, G. Patent: WO 0100843-A 167 04-JAN-2001;
BASF AKTIENGESSELLSCHAFT (DE)). Die vom *serA*-Gen (SEQ-
15 ID-No. 12) von *Corynebacterium glutamicum* abgeleitete
Polypeptidkette wurde dann mit entsprechenden
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen aus der Datenbank
(GenBank) verglichen. Es zeigte sich, dass die
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* wie
20 die aus *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank-Accession-
Nummer AL123456) und einigen anderen Bakterien wie *Ba-
cillus subtilis* (Sorokin, A., Azevedo, V., Zumstein, E.,
Galleron, N., Ehrlich, S.D. und Serror, P. Microbiology
142 (Pt 8), 2005-2016 (1996)) und *Aquifex aeolicus*
25 (GenBank-Accession-Nummer AE000657) mit 530 Aminosäuren
ausserordentlich lang ist. Zu dieser Gruppe von Enzymen
zählen auch die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen aus
Tieren wie Ratte (Achouri Y., Rider M.H., Van Schaftin-
gen E. und Robbi M., 1997, Biochem. J., 323:365-370)
30 und Mensch (Cho HM, Jun DY, Bae MA, Ahn JD, Kim YH.,
2000, Gene 245(1):193-201) sowie Pflanzen (z. B. *Arabi-
dopsis thaliana*; Ho CL, Saito K., 2001, Amino Acids.
20(3):243-59). Die Analyse der Röntgenstruktur des

E. coli-Enzyms ergab, dass es aus drei funktionellen Domänen besteht: einer Nukleotidbindedomäne (Aminosäure 108 bis 294) für die Bindung von NAD/H, einer zweigeteilten Substratbindedomäne (Aminosäure 7-107 und 295-336), an der das 3-Phosphoglycerat bindet, sowie einer C-terminalen regulatorischen Domäne (Aminosäure 337-410), die für die allosterische Bindung des L-Serin verantwortlich ist (Schuller DJ, Grant GA, Banaszak LJ., 1995, Nature Struct. Biol. Vol 2 1:69-76). Der Aminosäuresequenzvergleich der drei 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Typen ergab, dass sie sich im Wesentlichen in der Länge der C-terminalen regulatorischen Domäne unterscheiden (Abb. 1).

Eine Clusteranalyse der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die aus vollständig sequenzierten Genomen bekannt sind, ergab, dass trotz der Unterschiede im C-Terminus alle diese Proteine zu einer Familie von Orthologen zählen, d. h. sie besitzen einen gemeinsamen evolutiven Ursprung, haben sich aber in den verschiedenen Spezies unterschiedlich entwickelt.

b) Konstruktion von Allelen des *serA*-Gens von *C. glutamicum* mittels PCR die für C-terminal verkürzte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Proteine codieren

Es wurden fünf verschiedene Muteine der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* erzeugt, die am C-Terminus unterschiedlich lange Deletionen aufwiesen (Abb. 2). Die Konstruktion der Deletionsmutanten erfolgte ebenso wie die Isolierung des Wild Typ *serA*-Gens mittels PCR. Hierzu wurde ein PCR-Primer (*serA*-f: 5'-TCTAGAGCCGGAGACGTGAATAAAAT-3') erzeugt, der homolog

zu einer Region 240 bp vor dem Start-Codon des Gens war, um so den gesamten Promotorbereich zu erfassen. Dieser Primer wurde für alle Konstrukte gleichermaßen verwendet und trägt am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xba*I. Zur Amplifikation des vollständigen *serA*-Gens wurde ein zweiter, revers-komplementärer Primer ausgewählt, der 199 bp hinter dem Stop-Codon lag und eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle trägt (*serA*-r: 5'-GGATCCGACTGGTGAGGGTCAAGTCC-3'). Das erwartete PCR-Produkt hat eine Länge von 2040 bp. Zur Erzeugung der Deletionen wurden revers-komplementäre Primer ausgewählt, die im Genbereich liegen, und alle ebenfalls eine Schnittstelle für *Bam*HI tragen. Der Primer *serAA211*-r (5'-GGATCCTTAACCGGAAACGTTTCACAGC3') liegt 956 bp hinter dem Start-Codon, so dass ein 1196 bp langes PCR-Produkt entsteht. Hierdurch werden die letzten 211 Aminosäuren der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase abgeschnitten. Die Deletion liegt etwa im Bereich des vermutlichen Übergangs von Substratbinde- zu regulatorischer Domäne (vergl. Abb. 1 und Abb. 2). Der Primer *serAA205*-r (5'-GGATCCTTACTCTTCGCCCACGCGACC3') liegt 974 bp hinter dem Start-Codon und das zu erwartende PCR-Produkt hat eine Länge von 1214 bp. Die C-terminale Deletion beträgt in diesem Fall 205 Aminosäuren und das Protein endet hinter der Aminosäure Glutamat an Position 325. Der ungerichtet erzeugte Austausch dieser Aminosäure zu Lysin führt in *C. glutamicum* zu einer Deregulation der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (EP 0 931 833). Beide Deletionen liegen in einem Bereich, in dem auch die Deletion (Δ 209 Aminosäuren) des Proteins aus Ratte erzeugt wurde (Achouri Y., Rider M.H., Van Schaftingen E. und Robbi M., 1997, Biochem. J., 323:365-

370). Die beiden Primer *serA*Δ197-r
(5'-GGATCCTTAAGCCAGATCCATCCACACAG3') und *serA*Δ188-r
(5'-GGATCCTTACTTGCCAGCAAGAAGACC3') liegen 998 bp bzw.
1025 bp hinter dem ATG und befinden sich stromaufwärts
5 vom Übergang Substratbindedomäne zu regulatorischer Do-
mäne in *E. coli*. Die nach PCR zu erwartenden DNA-
Fragmente erzeugen Polypeptidketten die entsprechend um
197 bzw. 188 Aminosäuren kürzer sind als die vollstän-
dige 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase. Die kürzeste De-
10 letion wird durch Primer *serA*Δ79-r (5'-
GGATCCTTAATCCAGGCCACGGCCATT3') erzeugt und schneidet
den Bereich von 79 Aminosäuren ab, der die größte Ähn-
lichkeit zur regulatorischen Domäne von *E. coli* auf-
weist (Abb.2). Zusätzlich wurde in allen revers-
15 komplementären Primern, die zu einem verkürzten Protein
führen sollen hinter der Schnittstelle das Stop-Codon
TAA eingefügt.

Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von
20 200 μM Deoxynukleotid-triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP,
dTTP), je 1 μM des entsprechenden Oligonukleotids, 100
ng chromosomaler DNA von *Corynebacterium glutamicum*
ATCC13032, 1/10 Volumen 10-fach Reaktionspuffer und 2,6
Einheiten einer hitzestabilen Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-
25 Mischung (Expand High Fidelity PCR System der Firma Ro-
che Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in einem Ther-
mocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA)
unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C für 60
Sekunden, 50°C für 90 Sekunden und 72°C für 2 Minuten.

30

Nach der PCR-Reaktion wurden die erhaltenen DNA-
Fragmente mit dem QIAExII Gelextraktionskit (Qiagen)

nach Angaben des Herstellers aus einem 0,8 %igen Agarose-Gel isoliert, blunt-end mit Hilfe des Sure Clone-Kits (Amersham Pharmacia Biotech) in die *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Die Plasmide wurden durch Restriktionskartierung auf Richtigkeit überprüft. Diese Klonierung erfolgte in dem *Escherichia coli* Stamm DH5 α mc^r (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649).

10

Anschließend wurde das *serA*-Gen und die *serA*-Deletionskonstrukte in den *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor pZ1 (Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, *Appl Environ Microbiol* 55(3): 684-688) kloniert. Der Vektor vermittelt eine Kanamycin-Resistenz. Hierzu wurden die Inserts der Deletionskonstrukte jeweils mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Bam*HI aus dem pUC18-Vektor ausgeschnitten. Die überhängenden DNA-Enden wurden mittels Klenow-Behandlung aufgefüllt und die Fragmente wurden blunt-end in den *Sca*I-geschnittenen Vektor pZ1 ligiert. Das Wild Typ *serA*-Gen wurde nach *Eco*RI-Restriktion ebenfalls Klenow behandelt und blunt-end in den *Sca*I-geschnittenen Vektor pZ1 ligiert. Die so erhaltenen Konstrukte wurden pZ1*serA* (Abb. 3), pZ1*serA* Δ 79 (Abb. 4), pZ1*serA* Δ 188 (Abb. 5), pZ1*serA* Δ 197 (Abb. 6), pZ1*serA* Δ 205 (Abb. 7) und pZ1*serA* Δ 211 (Abb. 8) genannt.

25

2. Überexpression des Wild Typ *serA*-Gens sowie der verkürzten *serA*-Allele in *C. glutamicum*

30

Die Plasmide pZ1*serA*, pZ1*serA* Δ 79, pZ1*serA* Δ 188 pZ1*serA* Δ 197 pZ1*serA* Δ 205 und pZ1*serA* Δ 211 wurden durch

Elektroporation einzeln in *C. glutamicum* eingebracht. Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pZ1 ebenfalls nach *C. glutamicum* ATCC 13032 elektroporiert. Die so erhaltenen Stämme 13032pZ1, 13032pZ1serA, 13032pZ1serAA Δ 79, 5 13032pZ1serAA Δ 188, 13032pZ1serAA Δ 197, 13032pZ1serAA Δ 205 und 13032pZ1serAA Δ 211 wurden dann auf Überexpression der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mittels 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Enzymtest analysiert. Hierzu wurden die sechs Stämme in Komplexmedium (CgIII = 2,5 g 10 NaCl, 10 g Bacto-Peptone, 10 g Bacto-Yeast Extract, pH 7,4 mit 2 % Glukose) gezüchtet, und das Minimalmedium CGXII jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al. beschriebenen Medium CGXII (Journal of Bacteriology 15 (1993) 175: 5593-5603), enthielt aber zusätzlich 25 μ g/mL Kanamycin. Die Zusammensetzung des von Keilhauer et al. beschriebenen Mediums ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mediums CGXII

Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	30 mg/L

Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei OD₆₀₀ von 5 bis 8 geerntet und zweimal in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen. Die Zellpellets wurden anschliessend bis zum Aufschluss bei -20°C eingefroren. Die eingefrorenen Zellpellets wurden dann auf Eis aufgetaut und mit 2 ml kaltem 100 mM Tris-HCl pH 7,5/10 % Glycerin resuspendiert und in einem Brenson Sonifier 10 min aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C in einer Sigma -202 MK Zentrifuge abgetrennt. Die so erhaltenen Überstände wurden als Rohextrakte zunächst über eine PD-10 Säule nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) entsalzt und dann sofort.

in die Enzymmessung eingesetzt. Der Enzymtest beruht auf dem photometrischen Nachweis der Bildung von NADH in der Reaktion 3-Phosphoglycerat und NAD zu Phosphohydroxypyruvat zu NADH. Der Testansatz ist in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2: Komponenten des Testansatzes zur Bestimmung der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität

	Stammlösung	Endkonzentration
Tris-HCl; pH 8.8	500 mM	100 mM
Dithiothreitol	100 mM	1 mM
EDTA	500 mM	5 mM
Hydrazin	250 mM	10 mM
NAD	20 mg/ml	2 mg/ml
RE	ca. 2 mg/ml	ca. 200 µg Protein
3-Phosphoglycerat	150 mM	15 mM

10

Mit diesem Testansatz konnte für die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase des Wild Typs eine spezifische Aktivität von ca. 150 mU/mg Protein bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Überexpression des vollständigen *serA*-Gens eine etwa 16-fache Steigerung der spezifischen 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Aktivität ergibt. Das Konstrukt *serAA197* ermöglichte eine 10-fache Überexpression gegenüber dem Wild Typ-Protein. Die Konstrukte *serAA188* und *serAA205* lassen sich 3 bis 3,4-fach überexprimieren, wohingegen für die Konstrukte *serAA205* und *serAA79* nur eine 1,2 bis 1,5-fache Überexpression möglich war. Damit ist gezeigt, dass das durch Deletion der C-terminalen 197 Aminosäuren der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* erzeugte Mutein *Se-*

15

20

rAA197 funktionell ist, und mehr als 60 % der Wild Typ Aktivität aufweist.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

5

Tabelle 3: Überexpression des *serA*-Gens sowie der C-terminal verkürzten *serA*-Allele.

Stämme	spez. PGD-Aktivität [U/mg Protein]	Faktor der Überexpression
13032pZ1	130	1.0
13032pZ1 <i>serA</i>	2140	16.5
13032pZ1 <i>serA</i> Δ79	190	1.5
13032pZ1 <i>serA</i> Δ188	440	3.4
13032pZ1 <i>serA</i> Δ197	1320	10.0
13032pZ1 <i>serA</i> Δ205	390	3.0
13032pZ1 <i>serA</i> Δ211	150	1.2

* Die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Aktivität im Stamm 13032pZ1 wurde auf 1,0 normiert

10

3. Untersuchungen zur Inhibition der Wild Typ 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* und des C-terminal verkürzten Muteins *SerA*Δ197 durch L-Serin

15

Im Folgenden wurde getestet, ob das um den C-Terminus verkürzte Mutein *SerA*Δ197 nicht mehr durch L-Serin ge-

hemmt werden kann. Dazu wurde zunächst die Hemmbarkeit der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase des Wild Typs in zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* durch L-Serin anhand des oben beschriebenen Enzymtests untersucht.

- 5 Hierzu wurden dem Testansatz zusätzlich 1, 5 und 10 mM L-Serin zugesetzt und 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 15 mM 3-Phosphoglycerat gestartet. Die Inkubation war notwendig um eine Hemmung nachweisen zu können (Tab. 4). Diese Zeitabhängigkeit der L-Serin-Hemmung, die mehrere Minuten In-
- 10 kubation benötigt, bevor ein konstanter Level der Inhibition erreicht wird, wurde auch schon für andere 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, z. B. für das aufgereinigte Enzym von *B. subtilis* beschrieben (Saski R. und Pitzer L., 1975, *Eur. J. Biochem.*, 51:415-427).
- 15

Tabelle 4: Inhibition der Wild Typ 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* durch L-Serin

L-Serin [mM]	relative 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität [%]	
	ohne Inkubation	5-minütige Inkubation bei 30°C
0	100*	100*
1	106	96
5	112	82
10	104	56

- 20 * Die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase ohne Zusatz von L-Serin wurde auf 100% gesetzt.

Auf diesem Ergebnis aufbauend wurde die L-Serin-Inhibition der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase in den Stämmen 13032pZ1serA und 13032pZ1serAA197 untersucht. Es zeigte sich, dass tatsächlich das C-terminal verkürzte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Mutein nicht mehr signifikant durch L-Serin gehemmt werden kann (Tab. 5).

Tabelle 5: Inhibition der überexprimierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase durch L-Serin in den Stämmen 13032pZ1serA und 13032pZ1serAA197

L-Serin [mM]	relative 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität [%] **	
	13032pZ1serA	13032pZ1serAA197
0	100*	100*
10	34	95

* Die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase ohne Zusatz von L-Serin wurde auf 100% gesetzt

** Bestimmung der Aktivität nach 5-minütiger Inkubation bei 30°C mit und ohne L-Serin

Damit ist es gelungen, durch Deletion des C-Terminus der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* gezielt ein dereguliertes 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Mutein zu generieren.

4. Gesteigerte Akkumulation von L-Serin durch Überexpression des Gens für die deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (serAA197)

Zur Analyse der L-Serinausscheidung des Stammes mit deregulierter 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase wurden die Plasmide pZ1, pZ1serA und pZ1serA Δ 197 in den Stamm *Corynebacterium glutamicum* 13032 Δ panBC transformiert (E. Radmacher, A. Vaitsikova, U. Burger, K. Krumbach, H. Sahm, L. Eggeling, 2002, *Appl. Environ. Microbiol.* (Publikation in Vorbereitung)). Dieser Stamm ist durch die Deletion der Pantothenat-Biosynthese Gene *panB* und *panC* Pantothenat-auxotroph, und zeichnet sich dadurch aus, dass er unter Pantothenat-Limitation aufgrund einer verstärkten Akkumulation von Pyruvat ca. 50 mM Alanin und 8 mM Valin ausscheidet. Darüberhinaus bildet der Stamm ca. 100 μ M L-Serin und eignet sich somit als Ausgangsstamm für die Konstruktion eines L-Serin-Produzenten. Der Stamm mit dem Plasmid pZ1serA transformierte Stamm 13032 Δ panBCpZ1serA wurde gemäß Budapester Vertrag am 11.04.2002 bei der DSMZ unter der DSM Nr. 14922 hinterlegt.

Zur Untersuchung der L-Serinausscheidung wurden die drei Stämme in Komplexmedium (CgIII mit 2% Glukose und mit 50 μ g/l Kanamycin) gezüchtet, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 50 μ g/l Kanamycin und 1 μ M Pantothenat. Es wurden zwei unabhängige Fermentationen durchgeführt. Nach Kultivierung für 24 bzw. 35 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte L-Serinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitchromatographie (J Chromat (1983) 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 6

dargestellt, und es zeigt sich, daß schon die Überexpression des Wildtyp *serA*-Gens eine ca. 10%ige Steigerung der L-Serin-Akkumulation im Medium hervorruft. Die Überexpression der deregulierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase erzielt dagegen sogar eine Steigerung von bis zu 40% im Vergleich zum Kontrollstamm der nur das Leerplasmid trägt. Somit stellt die Nutzung des konstruierten und beschriebenen Gens für das deregulierte L-Serin-Biosynthese Enzym 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase ein Verfahren dar, um die L-Serinbildung entscheidend zu verbessern.

Tabelle 6: Akkumulation von L-Serin im Kulturüberstand von *Corynebacterium glutamicum* 13032 Δ panBC nach Expression der Gene *serA* bzw. *serAA197*

Stamm	t [h]	TG [mg/ml]	L-Serin [μ M]	L-Serin/TG [mg/g]
13032DpanBCpZ1	24	18,3	164	0,9
13032DpanBCpZ1 <i>serA</i>	24	14,7	163	1,2
13032DpanBCpZ1 <i>serAA197</i>	24	16,5	199	1,3

* TG = Zelltrockengewicht

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Forschungszentrum
Jülich GmbH
Inst. für Biotechnologie I
52425 Jülich

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: 13032ApanBC pZ1 serA	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14922
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2002-04-11 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vernehmung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weis</i></p> <p>Datum: 2002-04-12</p>


¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Forschungszentrum
Jülich GmbH
Inst. für Biotechnologie I
52425 Jülich

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Forschungszentrum Jülich GmbH Anschrift: Inst. für Biotechnologie I 52425 Jülich	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeleitete EINGANGSNUMMER: DSM 14922 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2002-04-11
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2002-04-11 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> ¹ lebensfähig <input type="checkbox"/> ¹ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2002-04-12

Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
 In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer i und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
 Zutreffendes ankreuzen.
 Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen
serA gemäß SEQ ID No 1 oder ein Allel, Homolog oder
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser
5 hybridisierende Nukleotidsequenzen.
2. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen
serA gemäß SEQ ID No 2 oder ein Allel, Homolog oder
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser
10 hybridisierende Nukleotidsequenzen.
3. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen
serA gemäß SEQ ID No 3 oder ein Allel, Homolog oder
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser
15 hybridisierende Nukleotidsequenzen.
4. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen
serA gemäß SEQ ID No 4 oder ein Allel, Homolog oder
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser
20 hybridisierende Nukleotidsequenzen.
5. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen
serA gemäß SEQ ID No 5 oder ein Allel, Homolog oder
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser
25 hybridisierende Nukleotidsequenzen.
6. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,

dass sie aus coryneformen Bakterien isoliert werden.

7. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass sie aus Corynebacterium oder Brevibacterium
isoliert werden.
8. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie aus Corynebacterium glutamicum oder Brevi-
10 bacterium flavum isoliert werden.
9. Genstruktur enthaltend wenigstens eine Nukleotidse-
quenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 sowie mit diesen
operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.
10. Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz
15 gemäß Anspruch 1 bis 8 oder eine Genstruktur gemäß
Anspruch 9 sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur
Selektion, zur Replikation in der Wirtszelle oder
zur Integration in das Wirtszell-Genom.
11. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase oder
20 ein Teil davon, codiert durch eine Nukleinsäurese-
quenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.
12. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach
Anspruch 11,
mit einer Aminosäuresequenz,
25 gemäß SEQ ID No 7 oder einer modifizierten Form
dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon.
13. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach
Anspruch 11,
mit einer Aminosäuresequenz,

- gemäß SEQ ID No 8 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
14. Derregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach Anspruch 11,
5 mit einer Aminosäuresequenz,
gemäß SEQ ID No 9 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
15. Derregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach Anspruch 11,
10 mit einer Aminosäuresequenz,
gemäß SEQ ID No 10 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
16. Derregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach Anspruch 11,
15 mit einer Aminosäuresequenz,
gemäß SEQ ID No 11 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
17. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß sie aus coryneformen Bakterien stammen.
18. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie aus Corynebacterium oder Brevibacterium stammen.
- 25 19. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie aus Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium flavum stammen.

20. Mikroorganismus enthaltend wenigstens eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 bis 8 in replizierbarer Form, welche im Vergleich zum Wild Typ Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist.
21. Mikroorganismus gemäß Anspruch 20 enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur gemäß Anspruch 9 oder einen Vektor gemäß Anspruch 10.
22. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 21 enthaltend wenigstens ein Polypeptid gemäß Anspruch 11 bis 19, welcher eine im Vergleich zu dem entsprechenden Wild Typ Stamm aktive deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aufweist.
23. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass er ein coryneformes Bakterium ist.
24. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass er zur Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium gehört.
25. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass er zu Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium flavum gehört.
26. Sonde zur Identifizierung und /oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligten Proteinen, dadurch gekennzeichnet,

dass sie ausgehend von Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält.

27. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin,
5 dadurch gekennzeichnet, daß

- a) wenigstens eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 isoliert aus einem coryneformen Bakterium in einen Mikroorganismus übertragen wird und dort exprimiert wird, wobei die Genexpression und/oder
10 die Aktivität des entsprechend codierten Polypeptids gegenüber dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöht ist,
- b) dieser genetisch veränderte Mikroorganismus aus Schritt b) zur mikrobiellen Herstellung eingesetzt
15 wird und
- c) das entsprechend gebildete L-Serin aus dem Kulturmedium isoliert wird.

1/8

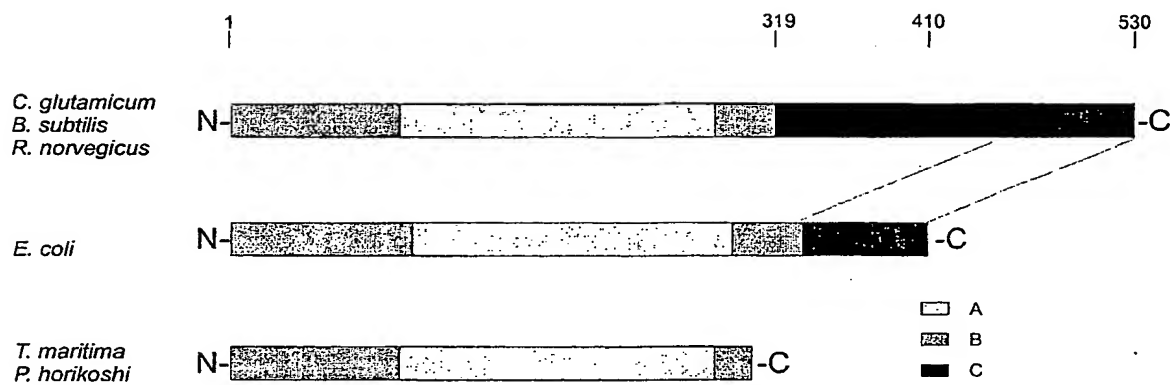


Fig. 1

DT12 Rec'd PCT PTO

JAN 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/8

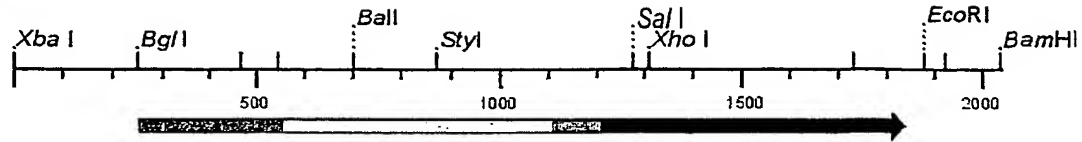
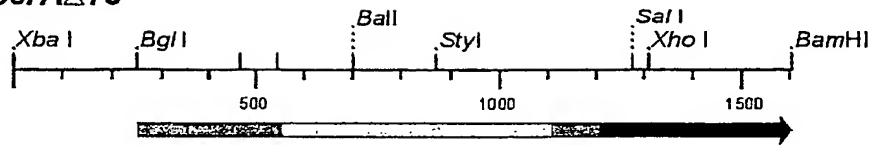
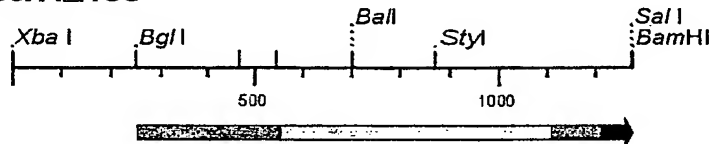
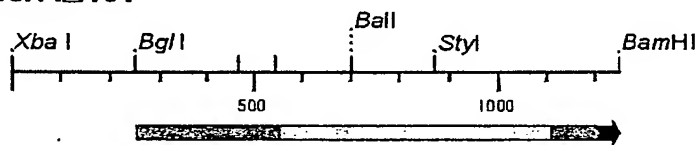
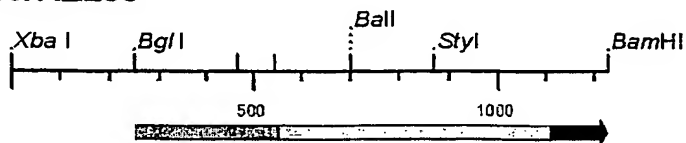
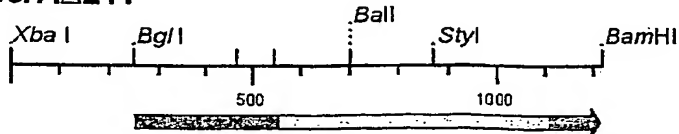
serA**serA Δ 79****serA Δ 188****serA Δ 197****serA Δ 205****serA Δ 211**

Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/8

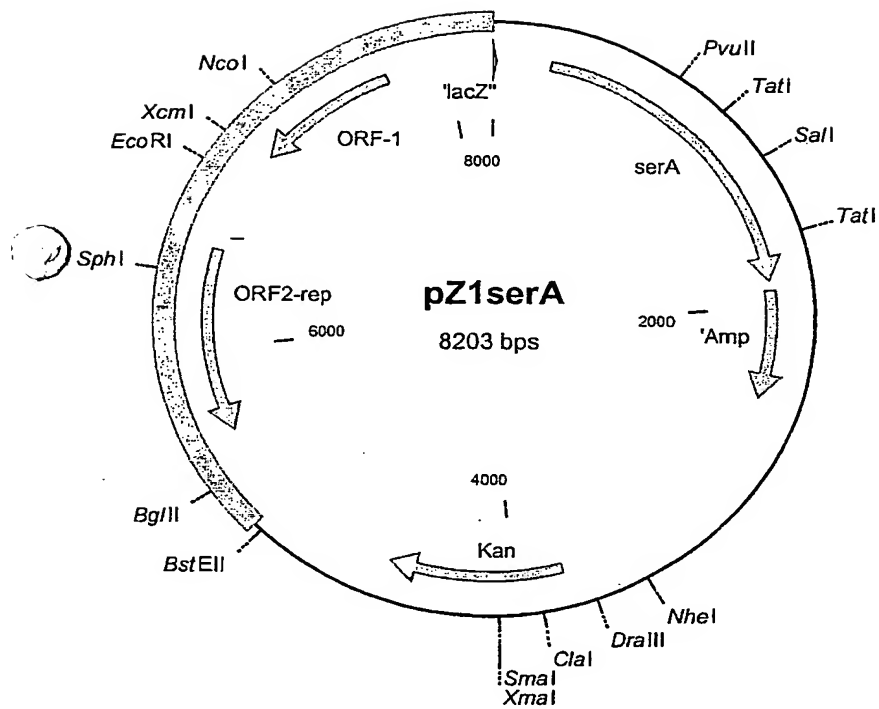


Fig. 3

DT12 Rec'd PCT/PTO. J 7 JAN 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 8

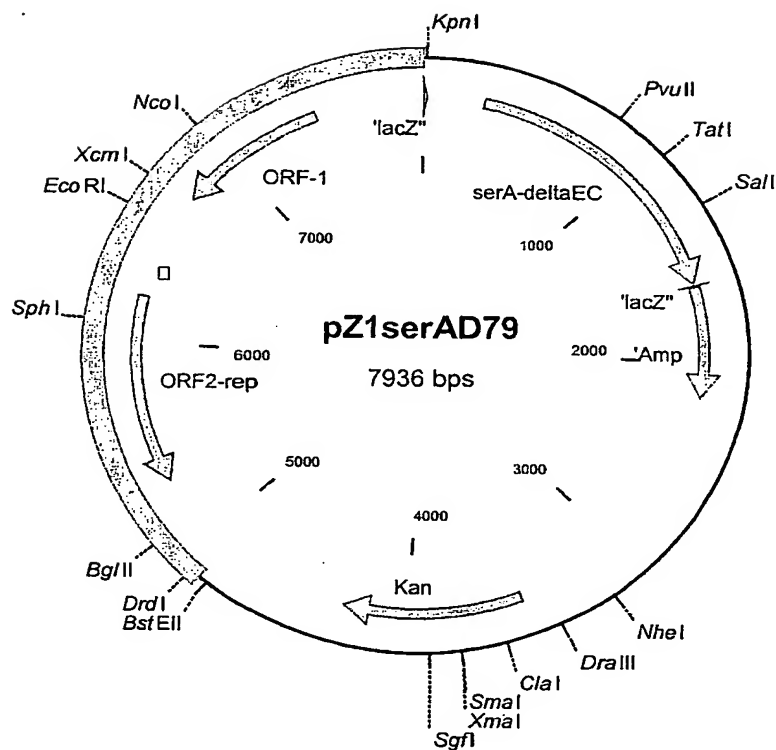


Fig. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/8

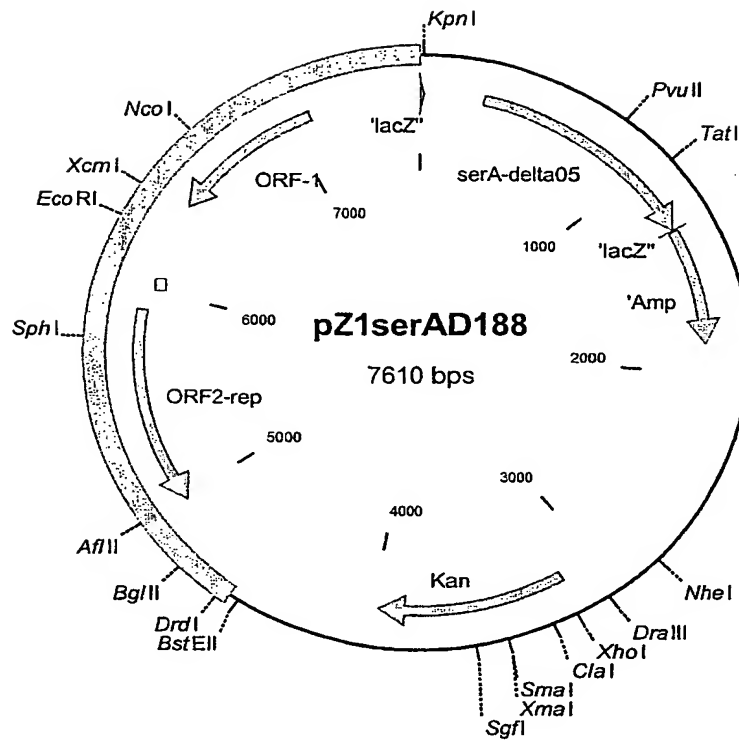


Fig. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

6/8

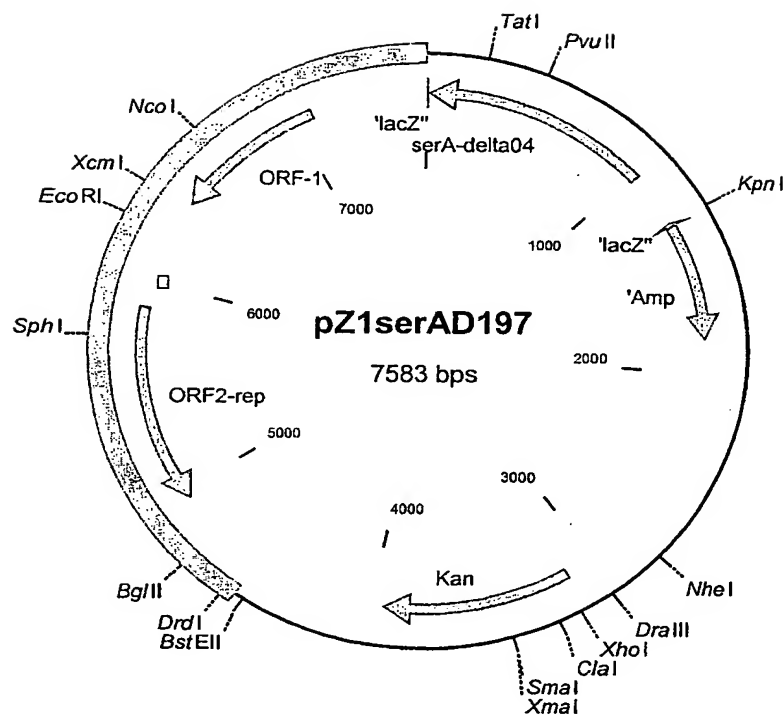


Fig. 6

DT12 Rec'd PCT/PTO 07 JAN 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/8

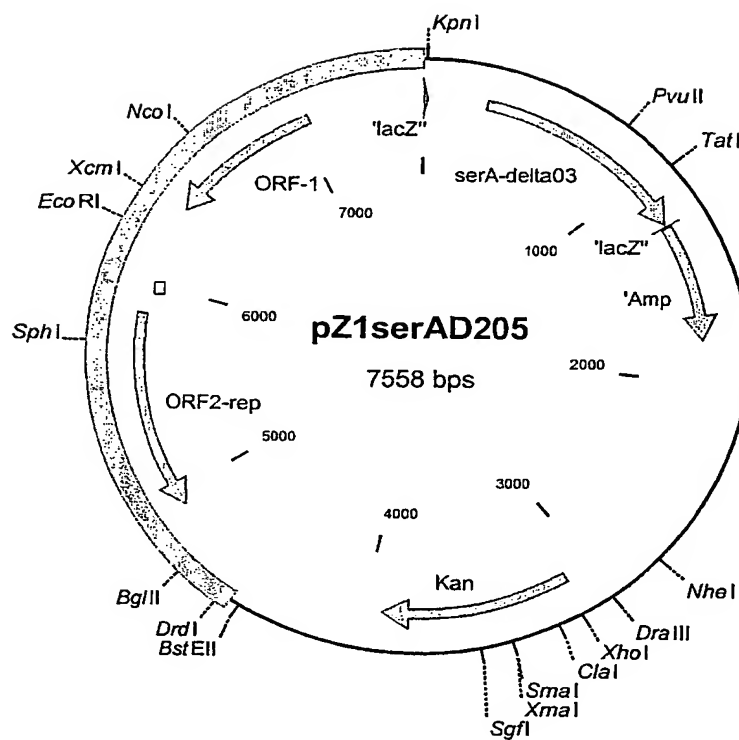


Fig. 7

DT12 Rec'd PCT/PTO, J 7 JAN 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/8

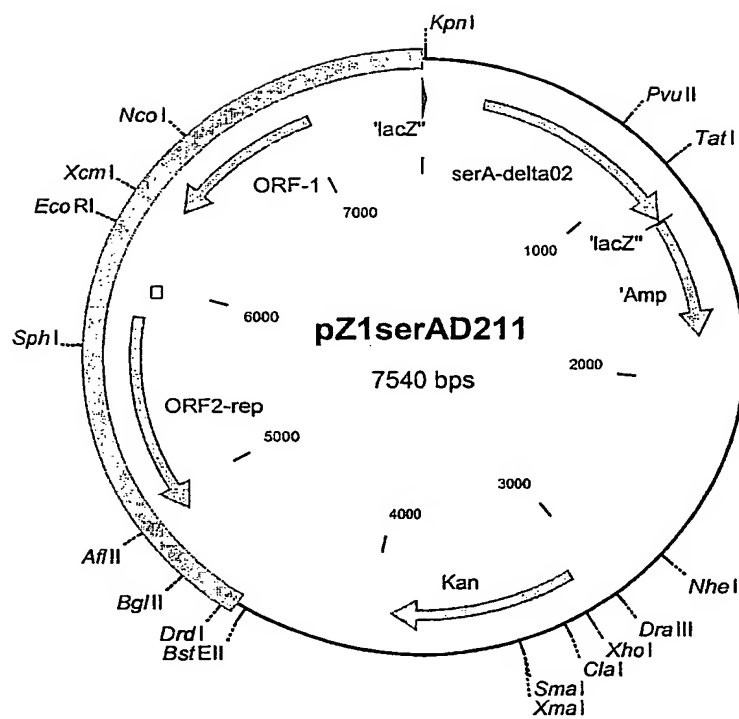


Fig. 8

DT12 Rec'd PCT/PTO J 7 JAN 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien kodierend für
an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine
sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin

<130> 1.2002

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1253

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

```
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggagggtt tagaatgttt ctagtgcgac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcctagttt ttccaggagt 240
aacttgtagg ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctgttgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttggtg tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggaacaacg tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcaactccgt tgtgagcag caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattggtgc ttacgaccc tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt 840
ctgactttgt caccattcac ctccctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggta cattcgtggc gctggtttcg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttggtg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgctggg actgacgttg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
tggttcgcgt gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggcttaagga tcc 1253
```

<210> 2

<211> 1607

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

```
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggaggggtt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcttagttt ttccaggagt 240
aacttgtagag ccagaatggc cgtccggtag tcctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctggtgacgc gcttggagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggaacaagt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttget aacgcaccga 540
cctctaatat tcaactccgt tgtgagcagc caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgag acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggtg tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgag tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttgggt gatgagattg agtccggtca cattcgtggc gctggtttctg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttgttg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gtggctcgcgt gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttggtcttc 1260
ttgctggcaa gcttgctgac gccgcccag tctccattga ggttgaggct cgaggcgagc 1320
tttcttccga gcaggctgat gcacttggtt tgtccgctgt tcgtggtttg ttctccggaa 1380
ttatcgaaga gtccgttact ttctgcaacg ctctcgcgt tgctgaagag cgtggcctgg 1440
acatctcgtg gaagaccaac tctgagtcgt ttactcaccg ttccgtcctg cagggtcaagg 1500
tcattactgg cagcggcgcg agcgcaactg ttgttggtgc cctgactggg cttgagcgcg 1560
ttgagaagat caccgcgcatc aatggccgtg gcctggatta aggatcc 1607
```

<210> 3

<211> 1280

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 3

```
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggaggggtt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcttagttt ttccaggagt 240
aacttgtagag ccagaatggc cgtccggtag tcctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctggtgacgc gcttggagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggaacaagt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttget aacgcaccga 540
```

```

cctctaatat tcactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctct tctttcaacg 660
gtgtggaaat ttccggaaaa actgtcggtg tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccggt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccgggtca cattcgtggc gctggtttcg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttgttg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggtcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gtggtcgcgt gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttggtcttc 1260
ttgctggcaa gtaaggatcc                                     1280

```

<210> 4

<211> 1229

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4

```

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatggtg agacaccttt gggggtaaat ctacacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggagggtt tagaatgttt ctatgcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttctagttt ttccaggagt 240
aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctggtgacgc gcttggagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctct tctttcaacg 660
gtgtggaaat ttccggaaaa actgtcggtg tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccggt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccgggtca cattcgtggc gctggtttcg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttgttg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggtcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gtggtcgcgt gggcgaagag taaggatcc                                     1229

```

<210> 5

<211> 1211

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaatt ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggaggggtt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcctagttt ttccaggagt 240
aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctgttgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggaacaagt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcaactccgt tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttg ttagatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tgggtgagtt ggatgagctg atgagccgtt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggtca cattcgtggc gctggtttcg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctctttgtt caagttgcct caggttgttg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggtcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggtggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gttaaggatc c 1211

<210> 6

<211> 2043

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 6

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaatt ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggaggggtt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcctagttt ttccaggagt 240
aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctgttgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggaacaagt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcaactccgt tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttg ttagatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tgggtgagtt ggatgagctg atgagccgtt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggtca cattcgtggc gctggtttcg 1020

atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttgtt caagttgcct caggttggtg 1080
 tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggtcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140
 ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
 gtggctcgct gggcggaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttggtcttc 1260
 ttgctggcaa gcttgtcgac gccgccccag tctccattga ggttgaggct cgaggcgagc 1320
 tttcttcga gcaggtcgat gcacttggtt tgtccgctgt tcgtgggttg ttctccggaa 1380
 ttatcgaaga gtccgttact ttctgcaacg ctctcgcac tgctgaagag cgtggcctgg 1440
 acatctccgt gaagaccaac tctgagtctg ttactcaccg ttccgtcctg caggtcaagg 1500
 tcattactgg cagcggcgcg agcgcaactg ttgttggtgc cctgactggt cttgagcgcg 1560
 ttgagaagat caccgcgcat aatggcctg gcctggatct gcgcgcagag ggtctgaacc 1620
 tcttctgca gtacactgac gctcctgggt cactgggtac cgttggtacc aagctgggtg 1680
 ctgctggcat caacatcgag gctgctgcgt tgactcaggc tgagaagggt gacggcgctg 1740
 tcctgatcct gcgtgttgag tccgctgtct ctgaagagct ggaagctgaa atcaacgctg 1800
 agttgggtgc tacttccttc caggttgatc ttgactaatt agagatccat ttgcttgaac 1860
 cgccttccca tctttgaatt cattcaagggt ggtaaggcgg ttttcgctct tttataacag 1920
 ttttaaagggt agatttgga gagaagattt cccttaagaa aggttcttaa caaccatgcc 1980
 gcctgcgacg ctgttcaatg ttttgacttc agctggactt gaccctcacc agtctaagga 2040
 tcc 2043

<210> 7

<211> 333

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 7

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala

1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val

20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp

35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala

50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp

65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn

85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu

100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg

6/17

115 120 125
Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
130 135 140
Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145 150 155 160
Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
165 170 175
Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
180 185 190
Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205
Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220
Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240
Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255
Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270
Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285
Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300
Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320
Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala
325 330

<210> 8

<211> 451

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

7/17

<400> 8

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
 145 150 155 160

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
 245 250 255

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335

Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
340 345 350

Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
370 375 380

Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
385 390 395 400

Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
405 410 415

Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala
420 425 430

Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg
435 440 445

Gly Leu Asp
450

<210> 9

<211> 342

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 9

9/17

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
 145 150 155 160

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
 245 250 255

10/17

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335

Gly Leu Leu Ala Gly Lys
340

<210> 10

<211> 325

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 10

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg

WO 2004/007705

PCT/DE2003/002290

11/17

115

120

125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145 150 155 160

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu
325

<210> 11

<211> 319

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

12/17

<400> 11

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
 145 150 155 160

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
 245 250 255

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly
305 310 315

<210> 12

<211> 530

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 12

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
130 135 140

Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
145 150 155 160

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335

Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
340 345 350

Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
370 375 380

Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
385 390 395 400

Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
405 410 415

Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala
420 425 430

Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg
435 440 445

Gly Leu Asp Leu Arg Ala Glu Gly Leu Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Thr
450 455 460

Asp Ala Pro Gly Ala Leu Gly Thr Val Gly Thr Lys Leu Gly Ala Ala
465 470 475 480

Gly Ile Asn Ile Glu Ala Ala Ala Leu Thr Gln Ala Glu Lys Gly Asp
485 490 495

Gly Ala Val Leu Ile Leu Arg Val Glu Ser Ala Val Ser Glu Glu Leu
500 505 510

Glu Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp
515 520 525

Leu Asp
530

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 03/02290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/04 C12N15/53 C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, EMBL, MEDLINE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 943 687 A (AJINOMOTO KK) 22 September 1999 (1999-09-22) the whole document	1-27
X	-& DATABASE EMBL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. AAY31651 XP002255654 abstract	11-19
X	-& DATABASE EMBL 'Online! retrieved from EBI Database accession no. AR162219 XP002255655 abstract	1-27
X	US 6 180 373 B1 (WICH GUENTER ET AL) 30 January 2001 (2001-01-30) column 5, line 36 -column 6, line 67; examples 2-4	1-27
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 September 2003

Date of mailing of the international search report

10/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/02290

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 624 828 A (KATSUMATA RYOICHI ET AL) 29 April 1997 (1997-04-29) figure 1; examples 1,2 -----	1-27
A	ARCHER J A C ET AL: "A C-TERMINAL DELETION IN CORYNEBACTERIUM-GLUTAMICUM HOMOSERINE DEHYDROGENASE ABOLISHES ALLOSTERIC INHIBITION BY L THREONINE" GENE (AMSTERDAM), vol. 107, no. 1, 1991, pages 53-60, XP001155222 ISSN: 0378-1119 abstract page 55, left-hand column, paragraph 2 page 58, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3; figures 1,4,5 -----	1-27
P,X	PETERS-WENDISCH P ET AL: "3-Phosphoglycerate dehydrogenase from Corynebacterium glutamicum: The C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 60, no. 4, 20 December 2002 (2002-12-20), pages 437-441, XP002255644 ISSN: 0175-7598 the whole document -----	1-27
P,X	BELL JESSICA K ET AL: "De-regulation of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase by domain removal." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 269, no. 17, September 2002 (2002-09), pages 4176-4184, XP002255645 =ejb&page=aims September, 2002 ISSN: 0014-2956 the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

DE03/02290

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

Invention 1: Claims 1 and 12 entirely, 6-11, 17-27 in part

nucleic acid Seq. Id. No. 1 coding for deregulated
phosphoglycerate dehydrogenase as per Seq. Id. No. 7.

Invention 2: Claims 2 and 13 entirely, 6-11, 17-27 in part

nucleic acid Seq. Id. No.2 coding for deregulated
phosphoglycerate dehydrogenase as per Seq. Id. No. 8.

Invention 3: Claims 3 and 14 entirely, 6-11, 17-27 in part

nucleic acid Seq. Id. No. 3 coding for deregulated
phosphoglycerate dehydrogenase as per Seq. Id. No. 9.

Invention 4: Claims 4 and 15 entirely, 6-11, 17-27 in part

nucleic acid Seq. Id. No. 4 coding for deregulated
phosphoglycerate dehydrogenase as per Seq. Id. No. 10.

Invention 5: Claims 5 and 16 entirely, 6-11, 17-27 in part

nucleic acid Seq. Id. No. 5 coding for deregulated
phosphoglycerate dehydrogenase as per Seq. Id. No. 11.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/02290

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0943687	A	22-09-1999	JP 11266881 A	05-10-1999
			CN 1227264 A	01-09-1999
			EP 0943687 A2	22-09-1999
			EP 0931833 A2	28-07-1999
			JP 11253187 A	21-09-1999
			US 2003008358 A1	09-01-2003
			US 6258573 B1	10-07-2001
			US 6037154 A	14-03-2000
			CN 1227263 A	01-09-1999
US 6180373	B1	30-01-2001	DE 4232468 A1	31-03-1994
			AU 673374 B2	07-11-1996
			AU 4819093 A	26-04-1994
			BR 9307125 A	30-03-1999
			CN 1085950 A ,B	27-04-1994
			CZ 9500667 A3	12-03-1997
			DE 59303039 D1	25-07-1996
			WO 9408031 A1	14-04-1994
			EP 0662143 A1	12-07-1995
			ES 2089846 T3	01-10-1996
			FI 951439 A	27-03-1995
			HU 72925 A2	28-06-1996
			JP 3032013 B2	10-04-2000
			JP 7507693 T	31-08-1995
			RU 2111247 C1	20-05-1998
			SK 34195 A3	08-05-1996
US 5624828	A	29-04-1997	JP 3078312 B2	21-08-2000
			JP 4190794 A	09-07-1992
			US 5595894 A	21-01-1997
			DE 69109243 D1	01-06-1995
			DE 69109243 T2	31-08-1995
			EP 0487333 A2	27-05-1992
			KR 9405580 B1	21-06-1994

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)